

Pengaruh Penambahan Alfa Tokoferol dalam Pengencer CEP-D terhadap Motilitas Spermatozoa Sapi Limousin yang Disimpan pada Suhu Beku

Effect of Alpha Tocopherol Addition into CEP-D Diluent on Spermatozoa Motility of Limousin Bull Stored at Freezing Temperature

Eka Ayu Astrini*, Nur Ducha dan Nur Kuswanti

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

* e-mail: eka.ayuastrini@gmail.com

ABSTRAK

Proses penyimpanan spermatozoa pada suhu beku, dapat menimbulkan terjadinya senyawa radikal bebas, oleh karena itu perlu dilakukan penambahan alfa tokoferol sebagai antioksidan dalam pengencer. Tujuan penelitian ini adalah mendeskripsikan pengaruh alfa tokoferol dalam pengencer CEP-D terhadap daya gerak atau motilitas spermatozoa sapi Limousin yang disimpan pada suhu beku. Motilitas spermatozoa diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400X. Data hasil penelitian dianalisis menggunakan ANAVA pada taraf signifikansi 95% dan selanjutnya dilakukan uji Duncan. Motilitas *before freezing* dan *post thawing* tertinggi dihasilkan oleh dosis alfa tokoferol 3mM, yaitu $74,38 \pm 0,81$ dan $45,00 \pm 0,33$. Kesimpulan penelitian ini adalah penambahan alfa tokoferol dalam pengencer CEP-D dapat mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Limousin yang disimpan pada suhu beku dengan penambahan dosis alfa tokoferol terbaik 3 mM.

Kata kunci: Alfa tokoferol; pengencer CEP-D; spermatozoa sapi Limousin; motilitas

ABSTRACT

The storage of spermatozoa at freezing temperatures can create free radicals, therefore it is necessary to add alpha tocopherol as an antioxidant into the diluent. The aim of this research was motility of Limousin bull spermatozoa. The spermatozoa motility was observed using a light microscope with 400X magnification. Data were analyzed using ANOVA test on the significancy level of 95% and followed by Duncan test. The result showed that the highest motility of spermatozoa before freezing and post thawing occurred in 3 mM of alpha tocopherol with value of 74.38 ± 0.81 and 45.00 ± 0.33 . It can be concluded that the addition of alpha tocopherol into CEP-D diluent can maintain the motility of Limousin bull spermatozoa at freezing temperature with the best dose of 3 mM alpha tocopherol.

Key words: Alpha tocopherol; CEP-D diluent; Limousin bull spermatozoa; motility

PENDAHULUAN

Kematian spermatozoa yang cukup tinggi berkisar antara 20-80% dengan rata-rata 50% terjadi setelah proses pembekuan (Hardijanto dkk., 2010). Kematian spermatozoa ditimbulkan karena membran plasma spermatozoa rusak akibat peroksidasi lipid setelah penyimpanan beku. Peroksidasi lipid adalah proses yang kompleks diakibatkan karena reaksi *polyunsaturated fatty acid* atau asam lemak tak jenuh ganda yang menyusun fosfolipid membran sel dengan radikal bebas (Rizal dan Herdis, 2008; Herdis, 2005).

Penambahan antioksidan selama pembuatan pengencer semen dilakukan dengan tujuan untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh bebas yang timbul selama penyimpanan beku. Antioksidan adalah senyawa yang dapat

mencegah maupun memperlambat kerusakan lipid akibat reaksi radikal bebas dalam proses oksidasi (Afrianti, 2008). Alfa tokoferol merupakan salah satu zat antioksidan yang memiliki peran sebagai pemutus rantai radikal bebas (Martha dkk., 2013).

Alfa tokoferol bereaksi dengan menyumbangkan satu atom hidrogen dari gugus OH ke senyawa radikal bebas yang memiliki elektron tidak berpasangan, oleh karena itu hal tersebut menyebabkan terbentuknya radikal tokoferoksil yang bersifat tidak merusak dan stabil, sehingga dapat menghentikan tahap proses propagasi yang berantai (Bansal dan Bilaspuri, 2009). Akibat dari proses peroksidasi lipid adalah adanya kerusakan membran spermatozoa yang akan menurunkan fluiditas membran yang mana fungsi membran sebagai sarana transportasi

energy dalam bentuk ATP untuk pergerakan spermatozoa menjadi menurun (Hayati dkk., 2006).

Analisis motilitas spermatozoa merupakan salah satu komponen utama untuk evaluasi kualitas spermatozoa (Ducha *et al.*, 2012). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendiskripsikan pengaruh penambahan alfa tokoferol dalam pengencer CEP-D dalam mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Limousin yang disimpan pada suhu beku.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-Juni 2016 di Laboratorium *Teaching Farm* Gresik. Semen yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen segar dari bangsa sapi Limousin yang kemudian diencerkan dalam pengencer CEP-D dengan penambahan dosis alfa tokoferol yang berbeda. Bahan dan metode dalam penelitian ini berdasarkan penelitian Duchá *et al.* (2012) dan Duchá dkk. (2013) meliputi Tris, Fruktosa, Asam sitrat, NaCl, KCl, Sorbitol, $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, NaHCO_3 , NaHPO_4 , KH_2PO_4 , streptomisin, penisilin dan kuning telur ayam strain *hisex brown*. Bahan dihomogenkan dengan *deionized water*, tahap selanjutnya dilakukan suplementasi kuning telur sebesar 20% dan penambahan alfa tokoferol. Dosis alfa tokoferol yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0 mM, 1mM, 2mM, 3mM dan 4mM. Hasil dari tahapan suplementasi pengencer CEP-D dengan penambahan alfa tokoferol selanjutnya ditambahkan gliserol sebesar 7%.

Tahap selanjutnya dilakukan evaluasi kualitas semen segar sapi Limousin yang meliputi pH, volume, warna, konsentrasi, konsistensi, motilitas massa dan motilitas individu. Setelah dilakukan evaluasi kualitas semen segar sapi Limousin, dilakukan tahap pengenceran 1,2 dan 3. Pengenceran 1 dan 2 dilakukan pada suhu 36-37°C di dalam *water bath*. Penambahan volume pengenceran tahap 1 adalah sebesar 1:1 yang merupakan volume perbandingan volume semen segar dan volume pengencer. Penambahan volume pengenceran tahap 2 sesuai dengan rumus yang telah ditentukan. Pengenceran tahap 3 dilakukan di dalam *cool top*, ketika spermatozoa yang disimpan mencapai suhu 3-5°C.

Semen yang telah melalui tahap pengenceran 1, 2, dan 3 selanjutnya dievaluasi motilitasnya

(evaluasi *before freezing*), kemudian dilakukan tahap *filling sealing* atau tahap pengemasan semen ke dalam *straw*. Pada tahap selanjutnya, *straw* yang berisi semen diekuilibrasikan di dalam *cool top* yang bersuhu 3-5°C. Memasuki tahap *pre-freezing* yaitu *straw* diletakkan di dalam wadah yang akan dimasukkan ke dalam kontainer berisi nitrogen cair selama 9 menit. *Straw* hanya diletakkan 1 cm di atas permukaan nitrogen cair, dengan tujuan agar *straw* hanya terkena uap nitrogen cair saja. Setelah dilakukan tahapan *pre freezing*, maka dilanjutkan dengan tahapan *freezing* yaitu menenggelamkan *straw* berisi semen yang telah diencerkan menggunakan pengencer CEP-D ke dalam nitrogen cair yang bersuhu -196°C di dalam kontainer. Tahap selanjutnya adalah evaluasi *post thawing*, yaitu evaluasi yang dilakukan setelah penyimpanan spermatozoa selama 24 jam. Motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara mengamati gerakan spermatozoa yang progresif (maju ke depan) dengan konsentrasi spermatozoa dalam satu lapang pandang. Data hasil pengamatan motilitas diuji menggunakan ANAVA satu arah, diikuti dengan uji Duncan dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan perbedaan antar perlakuan.

HASIL

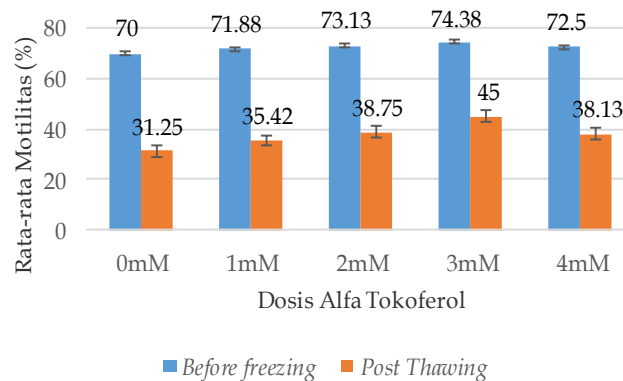
Berdasarkan hasil penelitian didapatkan rerata persentase \pm standar deviasi motilitas spermatozoa sapi Limousin dalam pengencer CEP-D dengan penambahan dosis alfa tokoferol yang berbeda. Persentase motilitas spermatozoa *before freezing* pada dosis 0 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM dan 4mM adalah 70,00 \pm 0,00; 71,88 \pm 0,79, 73,13 \pm 0,81; 74,38 \pm 0,81 dan 72,50 \pm 0,00, sedangkan persentase motilitas *post thawing* pada dosis 0 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM dan 4mM adalah 31,25 \pm 0,89, 35,42 \pm 1,40, 38,75 \pm 0,00, 45,00 \pm 0,33, 38,13 \pm 2,82. Rerata persentase motilitas spermatozoa \pm standar deviasi selengkapnya pada Tabel 1.

Gambar 1 menunjukkan grafik perubahan persentase motilitas spermatozoa sapi Limousin pada saat *before freezing* dan *post thawing* dalam pengencer CEP-D dengan penambahan dosis alfa tokoferol yang berbeda. Persentase motilitas tertinggi pada dosis 3 mM, sedangkan motilitas terendah pada dosis 0 mM.

Tabel 1. Rerata persentase motilitas spermatozoa sapi Limousin dengan penambahan berbagai dosis alfa tokoferol dalam pengencer CEP-D (%).

Tahapan Pengamatan	Perlakuan Alfa Tokoferol				
	0 mM	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM
<i>Before Freezing</i>	70.00±0.00 ^a	71.88±0.79 ^b	73.13±0.81 ^{bc}	74.38±0.81 ^c	72.50±0.00 ^b
<i>Post Thawing</i>	31.25±0.89 ^a	35.42±1.40 ^c	38.75±0.00 ^{bc}	45.00±0.33 ^d	38.13±2.82 ^b

Keterangan: Superskrip berhuruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0.05$)

**Gambar 1.** Histogram Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi Limousin dalam Pengencer CEP-D dengan Penambahan Dosis Alfa Tokoferol yang Berbeda.

PEMBAHASAN

Hasil uji ANAVA satu arah motilitas spermatozoa pada saat *before freezing*, menunjukkan bahwa penambahan alfa tokoferol ke dalam pengencer CEP-D memberikan pengaruh yang berbeda nyata, hal ini ditunjukkan oleh dosis alfa tokoferol 3 mM yang merupakan dosis terbaik dalam menghasilkan persentase motilitas spermatozoa yaitu sebesar 74,38%, berbeda dengan perlakuan 0 Mm yang menghasilkan persentase motilitas spermatozoa terkecil yaitu sebesar 70%. berdasarkan hal tersebut dapat dibuktikan bahwa penambahan alfa tokoferol dalam pengencer CEP-D mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pendinginan.

Perubahan suhu 37 °C menjadi 5 °C pada saat *before freezing* yang menyebabkan penurunan motilitas, diduga karena adanya *cold shock*. Gazali dan Tambing (2002); Rizal dan Herdis (2008) menjelaskan bahwa perubahan suhu dapat menyebabkan perubahan permeabilitas membran, perubahan komponen lipid dan penurunan motilitas spermatozoa. Pada perlakuan dengan dosis alfa tokoferol 3 mM menghasilkan persentase motilitas tertinggi dibandingkan dengan dosis 0 mM, tidak adanya alfa tokoferol yang berfungsi sebagai antioksidan di dalam pengencer tidak dapat menekan kerusakan spermatozoa selama penyimpanan suhu dingin (Suyadi dkk., 2012).

Hasil uji ANAVA satu arah motilitas spermatozoa pada saat *post thawing*, menunjukkan penambahan alfa tokoferol ke dalam pengencer CEP-D telah memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($P<0.05$). Dosis alfa tokoferol 3 mM dalam pengencer CEP-D mampu mempertahankan motilitas spermatozoa pada saat *post thawing*, dibuktikan dengan motilitas spermatozoa sebesar 45% sesuai dengan standar IB. Persentase tersebut lebih tinggi jika dibandingkan dengan persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan lain, yaitu dosis alfa tokoferol 0 mM, 1mM, 2mM dan 4mM menghasilkan persentase motilitas sebesar 31,25%; 35,42%; 38,75% dan 38, 13%.

Tingginya motilitas yang dihasilkan pada dosis 3 Mm disebabkan karena dosis tersebut merupakan dosis paling optimal dalam mempertahankan motilitas spermatozoa. Keberadaan alfa tokoferol dalam pengencer dapat menekan terjadinya peroksidasi lipid yang terjadi selama proses pembekuan maupun *thawing* (pencairan kembali) (Suyadi dkk., 2012). Spermatozoa melewati berbagai osmolaritas dan perubahan suhu yang ekstrem selama proses pembekuan dan pencairan kembali, sehingga dapat memicu terjadinya produksi *reactive oxygen species* (ROS). Kadar ROS yang terlalu tinggi menyebabkan terjadinya peroksidasi protein dan lipid (Moore *et al.*, 2005).

Keberadaan alfa tokoferol dalam pengencer semen bereaksi dengan cara menyumbangkan satu atom hidrogen dari gugus OH, yang terletak pada cincin kromanolnya ke senyawa radikal bebas. Hal tersebut menimbulkan terbentuknya radikal tokoferoksil yang stabil dan tidak merusak serta dapat menghentikan proses propagasi pada proses peroksidasi lipid di membran spermatozoa, akibatnya kondisi membran spermatozoa dapat terjaga dengan baik (Bansal dan Bilaspuri, 2009). Susilawati dkk. (2011) menjelaskan bahwa motilitas spermatozoa terjadi jika spermatozoa memiliki membran yang baik untuk menghasilkan energi gerak.

Pada perlakuan 0 mM, menghasilkan persentase motilitas spermatozoa paling rendah, disebabkan tidak adanya kandungan alfa tokoferol dalam pengencer yang akan menyebabkan peningkatan reaksi peroksidasi lipid yang berkepanjangan sehingga dapat merusak struktur matriks lipid dan menyebabkan membran menjadi tidak stabil, menurunkan fluiditas membran serta mengubah fungsi membran yang berfungsi sebagai sarana transportasi energi dalam bentuk ATP yang selanjutnya digunakan untuk pergerakan spermatozoa. Hayati dkk. (2006) menjelaskan bahwa, kerusakan membran spermatozoa menyebabkan terganggunya pompa ion-ion yang berperan untuk pergerakan atau motilitas spermatozoa.

Ion Ca^{2+} merupakan salah satu ion yang berperan sebagai pemicu motilitas spermatozoa (Asmarinah, 2010). Mekanisme masuknya ion Ca^{2+} ke dalam membran spermatozoa dengan bantuan metilsi fosfolipid. Adanya peningkatan ion Ca^{2+} di dalam sel spermatozoa akan merangsang enzim adenylate cyclase yang menghasilkan ATP kemudian diubah menjadi cAMP. cAMP membutuhkan suatu protein yaitu protein Kinase A (PKA) yang memiliki fungsi untuk menginisiasi pergerakan spermatozoa, akan tetapi mekanisme spesifik PKA dalam memicu motilitas spermatozoa belum diketahui (Susilawati, 2011; Knobil dan Neill's, 2006). Terganggunya proses pompa ion-ion yang berperan sebagai pemicu motilitas spermatozoa menyebabkan terjadinya penurunan motilitas spermatozoa. Guthrie dan Welch (2012) menjelaskan bahwa ciri kerusakan spermatozoa akibat peroksidasi lipid adalah terjadi penurunan motilitas spermatozoa.

SIMPULAN

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa penambahan alfa tokoferol dalam pengencer CEP-D dapat mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Limousin yang

disimpan pada suhu beku. Penambahan alfa tokoferol sebesar 3 mM dalam pengencer CEP-D paling baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Drh. Trilas Sardjito dan Drh. Suprayogi selaku pembimbing di Laboratorium *Teaching Farm* UNAIR Gresik, yang telah membimbing kami selama proses pengambilan data sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianti LH, 2008. *Teknologi Pengawetan Pangan*. Bandung: Alfabeta.
- Asmarinah, 2010. Peran Molekul Kanal Ion pada Fungsi Spermatozoa. *Maj.Kedokteran Indon.* 60(8):21-22.
- Bansal AK, dan Bilaspuri G, 2009. Antioxidant Effect of Vitamin E on Motility, Viability and Lipid Peroxidation of Cattle Spermatozoa Under Oxidative Stress. *Jurnal Anim Sci Papand Rep.* 27(1): 11-13.
- Ducha N, Susilawati T, Aulanni'am, Wahyuningsih S, 2013. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan pada Refrigerator dalam Pengencer CEP-2 dengan Suplementasi Kuning Telur. *Jurnal Kedokteran Hewan.* ISSN: 1978-225X.
- Ducha N, Susilawati.T, Aulanni'am, Wahyuningsih S, Pangestu M, 2012. Ultrastructure and Fertilizing Ability of Limousin Bull Sperm after Storage in CEP-2 Extender with and Without Egg Yolk. *Journal of Biology Science.* 15(20): 14-16
- Knobil and Neill's, 2006. *Physiology of Reproduction*. Editor: Jimmy D. Neill. 3rd Edition. USA: Elsevier Academic Press.
- Guthrie,H.D dan Welch GR. 2012. Effects of Reactive Oxygen Species on Sperm Function. *Theriogeno.* 78(1): 1700-1708.
- Gazali M, dan Tambing SN, 2002. Kriopersevasi Sel Spermatozao. *Jurnal Hayati.* 15(3): 27-32.
- Hardijanto, Susilowati, Hernawati, Sardjito T, dan Suprayogi, 2010. *Ilmu Inseminasi Buatan*. Surabaya: Universitas Airlangga Press.
- Hayati A, Mangkoewidjojo S, Hinting A, Moeljopawiro S, 2006. Hubungan kadar MDA spermatozoa dengan Integritas Membran Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*). Setelah pemaparan 2-Methoxyethanol. *Berk. Penel. Hayati.* 11(22):151-154.
- Herdis, 2005. *Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Teknologi pada Domba Garut*. Bogor: Institut Pertanian Bogor Press.
- Martha AS, Karwur FF, Rondonuwu FS, 2013. Mekanisme Kerja dan Fungsi Hayati Vitamin E pada Tumbuhan dan Mamalia. *Prosiding Seminar Nasional X FKIP UNS*.
- Moore AI, Squire EL, Graham JK, 2005. Adding Cholesterol to the Stallion Sperm Plasma Membrane Improves Cryosurvival. *Cryobiol.* 51(14): 241-249.

Rizal M dan Herdis. 2008. *Inseminasi Buatan pada Domba*. Jakarta: Rineka Cipta.
Susilawati,T. 2011. *Spermatology*. Malang: Universitas Brawijaya Press.

Suyadi A, Rachmawati, dan Iswanto N, 2012. Effect of alpha tocopherol in Tris Aminomethan Egg Yolk on the Semen Quality During Storage in Boer Goats. *Jurnal Ilmi-Ilmu Peternakan*. 22(3).